



TITLE:

軸不斉を有するフラビン酵素モデルの物性と水素移動反応の立体化学(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

國友, 潤

CITATION:

國友, 潤. 軸不斉を有するフラビン酵素モデルの物性と水素移動反応の立体化学. 京都大学, 1997, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1997-03-24

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/202448>

RIGHT:

氏 名	くにとも 友 潤
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 1820 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	軸不斉を有するフラビン酵素モデルの物性と水素移動反応の立体化学

論文調査委員	(主 査) 教 授 大 野 惇 吉	助教授 中 村 薫	助教授 田 中 和 彦
--------	----------------------	-----------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

フラビン酵素とは、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) やフラビンモノヌクレオチド (FMN) に代表されるリボフラビン誘導体を補酵素としてもつ酵素の総称で、様々な生体物質の酸化的代謝に関与している。フラビン補酵素はアポ蛋白に結合した形で酸化還元反応にあずかっており、酵素系が還元型ピリジン補酵素または特定の有機物の水素を受け取り、シトクロム系、ユビキノンあるいは分子状酸素に電子を渡す際の電子の転移に関与している。

フラビン酵素の活性中心において、フラビン補酵素は完全にキラルな環境下に存在し、さらにフラビン補酵素の近傍に存在するアポ蛋白の官能基はフラビン補酵素と基質との間の反応の立体化学に大きな影響を及ぼしている。そこで申請者は、アポ蛋白の官能基の機能をより詳しく調べる目的で、ピリミジン環部に2-置換フェニル基を導入した光学活性なフラビン酵素モデル (3-アリール-10-(4-*tert*-ブチルフェニル)ピリミド[4,5-*b*]キノリン-2,4(3*H*,10*H*)-ジオン) を合成した。

まず申請者は、これらの化合物の軸性キラリティーの安定性を調べる目的で、熱異性化反応をおこない、活性化パラメーターを算出した。その結果、いずれの化合物においても回転エネルギー障壁にエントロピー項はあまり寄与していないことを見出した。また、C(2')位のベンジル位の炭素が一級である化合物では、置換基の大きさが異なるにもかかわらず、回転エネルギー障壁の大きさにはあまり差がないことも見出した。申請者は、これらのモデル化合物の X 線結晶構造解析をおこなうことによって、C(2')位の置換基がフラビン環との間の立体反発を避けるような配座をとっていることが原因であることを提唱した。

酵素の活性中心においてアポ蛋白の官能基との間で水素結合を形成しているフラビン環の構造は、非酵素系の遊離の状態における構造とは大きく異なっている可能性がある。そこで申請者は、同じモデル化合物を用いて、結晶中で水素結合を形成しているときと形成していないときのフラビン環の構造を比較することによって、酵素の活性中心におけるフラビン環と遊離の状態におけるフラビン環との間の構造の違いを明らかにすることを試みた。申請者は、X 線結晶構造解析をおこなうことによって、酸化型フラビン

において形式的に二重結合で表される N(1)-C(10a) 結合と C(4a)-C(5) 結合はともに 0.023 Å 長くなっているのに対し、形式的に単重結合で表される C(10a)-C(4a) 結合は 0.021 Å 短くなっていることを見出した。この結果は、フラビン環のピリミジン環部位で水素結合が形成されると、酸化型のフラビン分子の構造が環元型のそれに近づき、それに伴って共役系の π 電子が N(1) 位の方に移動して N(5) 位の電子密度が低下することを強く支持している。

フラビン酵素モデルの反応の遷移状態の立体化学を明らかにするためには、モデル化合物の絶対配置を決定する必要がある。申請者は、異性化のおこらないキラルなフラビン化合物を合成し、X 線結晶構造解析をおこなうことによって、軸不斉を有するフラビン酵素モデルとしては初めてその絶対配置を決定することに成功した。さらに申請者は、この化合物を基にして、化学的及び分光学的手法を用いることによって、合成したすべてのフラビン酵素モデルの絶対配置の決定もおこなった。

次に申請者は、フラビンのピリミジン環部位の近傍に存在する置換基が基質との間の反応の立体化学に及ぼす影響を調べる目的で、フラビン酵素モデルと 1-ベンジル-1,4-ジヒドロニコチンアミドとの間の水素移動反応をおこなった。その結果、N(3) 位に (2-ヒドロキシメチル) フェニル基を有するモデル化合物の場合、マグネシウムイオン存在下での水素移動は立体的に混み合った *syn* 面側から優先的に起こっているのに対し、マグネシウムイオン非存在下での水素移動は *anti* 面側から優先的に起こっていることを見出した。申請者は、このヒドロキシメチル基が、マグネシウムイオンを配位して *syn* 側の面を選択的に活性化したり、立体障害として *syn* 側の面を選択的に不活性化したりすることによって、モデル化合物の反応面の選択性を支配していることを明らかにした。

さらに申請者は、水素移動反応の遷移状態における立体化学を調べる目的で、モデル化合物とキラルな 1,4-ジヒドロ-2,4-ジメチル-N-(α -メチルベンジル)-1-プロピルニコチンアミドとの間の不斉水素移動反応をおこなった。この実験結果を基にして、申請者は、反応系のマグネシウムイオンの有無にかかわらず、反応の遷移状態においては、フラビン酵素モデルのピリミジン環部位と NAD(P)H アナログのカルバモイル基が同じ方向に向き、かつ分子が重なり合った分子配列が最も有利であることを提唱した。

論文審査の結果の要旨

リボフラビン誘導体を補酵素として要求するフラビン酵素は生体内で多種多様な酸化還元反応に関与している。この酸化還元反応のメカニズムを明らかにする目的で、これまでに様々なフラビン補酵素モデルの反応性に関する研究がおこなわれてきた。しかし、フラビン補酵素がアポ蛋白に取り囲まれた完全にキラルな環境下におかれているという事実にもかかわらず、フラビン補酵素の機能にアポ蛋白の機能も導入した光学活性なフラビン酵素モデルの合成およびそれらの反応の立体化学に関する研究がおこなわれた例は極めて少ない。そこで申請者は、ピリミジン環部位に 2-置換フェニル基を導入したフラビン酵素モデル (3-アリール-10-(4-*tert*-ブチルフェニル)ピリミド[4,5-*b*]キノリン-2,4(3*H*,10*H*)-ジオン) を合成し、これらの化合物の物性および水素移動反応の立体化学を明らかにすることを検討した。

まず申請者は、モデル化合物の軸性キラリティーの安定性を調べる目的で、これらの化合物の熱異性化反応をおこなった。反応速度を測定し、活性化パラメーターを算出した結果、回転エネルギー障壁にエン

トロピー項はあまり寄与していないことが明らかとなった。これらのモデル化合物はビフェニル誘導体とは異なり、N-C 結合のまわりの回転が2個のカルボニル基で抑制されているという構造上の特徴を有していることから、この実験結果は軸不斉の化学に新たな知見を与えるものである。また、C(2')位の置換基の配座がN-C 結合のまわりの回転エネルギーに大きな影響を及ぼしていることを、活性化パラメーターの値からだけでなくX線結晶構造解析からも明らかにしている点で評価に値する。

また申請者は、モデル化合物のピリミジン環部位で尿素分子と水素結合を形成している複合体の結晶化およびそのX線結晶構造解析に成功した。さらに、その複合体の結晶中および同じモデル化合物1分子で形成されている結晶中のフラビン環の構造を比較することによって、フラビン環のピリミジン環部位で水素結合が形成されると、酸化型フラビンの構造が還元型のそれに近づくことを見出した。実際のフラビン補酵素もアポ蛋白の官能基との間で水素結合を形成されると、酸化型のフラビンの構造が還元型のそれに近づくと考えられる。申請者は、このような構造変化はフラビン補酵素のN(5)位の電子密度を低下させており、これがフラビン補酵素の反応性を高めている原因の1つであるという概念を提唱した。この概念は、水素結合によるフラビン補酵素の構造変化をその反応性と関連づけている点で非常に特色がある。

次に申請者は、フラビン酵素モデルとアキラルなNAD(P)Hアナログである1-ベンジル-1,4-ジヒドロニコミンアミドとの間の水素移動反応をおこない、フラビン分子の近傍に存在する置換基が反応の立体化学に及ぼす影響を明らかにすることを検討した。その結果、N(3)位に(2-ヒドロキシメチル)フェニル基を有するフラビン酵素モデルにおいては、マグネシウムイオン存在下では立体的に混み合った *syn* 面側からの水素移動が優先的に起こっているのに対し、マグネシウムイオン非存在下では *anti* 面側からの水素移動が優先的に起こっていることを見出した。さらに、マグネシウムイオンとの間の会合定数を測定することによって、ヒドロキシメチル基とマグネシウムイオンとの間の相互作用が、マグネシウムイオン存在下において立体的に不利な *syn* 面側からの水素移動を有利にしていることを見出した。以上の結果は、1つの極性官能基が反応の立体化学を支配していることを明らかにした点で注目値する。

さらに申請者は、N(3)位に(2-ヒドロキシメチル)フェニル基を有するフラビン酵素モデルとキラルなNAD(P)Hアナログである1,4-ジヒドロ-2,4-ジメチル-N-(α -メチルベンジル)-1-プロピルニコチンアミドとの間の不斉水素移動反応をおこない、反応の遷移状態における立体化学を明らかにすることを検討した。その結果、遷移状態においては、反応系のマグネシウムイオンの有無にかかわらず、フラビン酵素モデルのピリミジン環部位とNAD(P)Hアナログのカルバモイル基が同じ方向に向き、かつ分子面が重なり合った分子配列が最も有利であることを明らかにした。この分子配列はグルタチオンレダクターゼの活性部位におけるFADとNADPHの分子配列に類似しており、酵素の活性中心のように分子の配座を固定する立体因子が存在しないモデル反応系においてもこのような分子配列が観察されたことは非常に興味深い。

以上、本論文で申請者は、フラビン酵素中の水素移動反応において、フラビン補酵素の近傍に存在するアポ蛋白の極性官能基や補酵素の分子面の重なりによる安定化効果が反応の立体化学を支配していることを強く示唆している。このように反応の立体化学を支配する要素は、フラビン酵素の進化の過程において、フラビン補酵素と基質との間の反応の立体化学を確立する上で重要な役割を果たしてきたものと考えられ

る。このことから、申請者の研究は、酵素反応系で観察される反応性と立体化学の関係を解明する上で重要な知見を与えるものと言える。よって本論文は、博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、主論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について諮問した結果、合格と認めた。